

На правах рукописи

ДАО ТХИ ТХУИ ЛИНЬ

**СООБЩЕСТВО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ АЭРОБНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ СТОЧНЫХ ВОД СОВМЕСТНОГО
ПРОИЗВОДСТВА СТИРОЛА С ОКИСЬЮ ПРОПИЛЕНА**

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2014

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВПО “Казанский (Приволжский) федеральный университет”

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
академик АН РТ
Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, член-корреспондент
Российской Академии Естествознания
Дегтярева Ирина Александровна
(Государственное научное учреждение Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения Россельхозакадемии, заведующий лабораторией агроэкологии и микробиологии)

кандидат биологических наук, доцент
Зарипова Сания Кашафовна
(ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, заведующий комплексной лабораторией «Бионанотехнологии»)

Ведущая организация: ФГБУ Институт экологии и генетики
микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук

Защита диссертации состоится «25» декабря 2014 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВПО “Казанский (Приволжский) федеральный университет” по адресу: г. Казань, ул. К. Маркса, д. 74, Институт фундаментальной медицины и биологии в зале заседания ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО “Казанский (Приволжский) федеральный университет” по адресу г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Автореферат разослан «23» октября 2014г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

З. И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. На сегодняшний день одной из главных экологических проблем является загрязнение окружающей среды углеводородами, которые в большей степени присутствуют в нефтехимических сточных водах (СВ) (Holliger et al., 1997; Mantis et al., 2005; Wake, 2005; Coelho et al., 2006; Das, Chandran, 2011). Одним из типичных промежуточных соединений нефтехимических производств является стирол, который, как правило, производится совместно с окисью пропилена (Кирпичников с соавт., 1986; Тимофеев, Серафимов, 2003). В ходе различных этапов производства стирола с окисью пропилена (ПСОП), таких как дегидратация, дегидрирование и окисление, образуются высоко загрязненные СВ. Данная СВ характеризуется высокой концентрированностью и содержит летучие токсичные соединения, такие как фенол, ацетофенон (АЦФ), метилфенилкарбинол (МФК) и бензол, а также нелетучие соединения, такие как монопропиленгликоль (МПП), дипропиленгликоль (ДПП) и пр. Следовательно, актуальной становится проблема очистки таких нефтехимических СВ перед сбросом в окружающую среду, чтобы не вызывать загрязнение рек, почв и воздуха (Strømgren et al., 1995; Chen et al., 1998b; Jerez Vegueria et al., 2002; Chen et al., 2003). Биологическая очистка, как правило, является эффективным методом с низкой потребностью на операционные расходы (Shokrollahzadeh et al., 2008; Babaei et al., 2010; Chang et al., 2011). По этой причине был предложен процесс предварительной очистки СВ совместного ПСОП биологическим методом в биореакторе с использованием специализированных микроорганизмов, перед последующей очисткой активным илом. Этот подход считается наиболее перспективным для устранения вредных веществ во время предварительной обработки СВ (Erhan et al., 2004; Wasi et al., 2011; Park et al., 2013). Кроме того, на сегодняшний день данные о микробных сообществах, которые могли выдерживать экстремально высокие уровни химического потребления кислорода (ХПК) от 4000 до 16000 мг/л как в случае ПСОП, отсутствуют. Таким образом, идентификация микроорганизмов, ответственных за трансформацию углеводородов в данном биореакторе, является одной из важных задач фундаментальной микробиологии, изучающей метаболические пути, а также актуальна для практического применения.

Степень разработанности темы исследования. Исследования зарубежных ученых в области очистки СВ нефтехимических производств затрагивают микробные сообщества, развивающиеся при малых нагрузках по ХПК (Zhao et al., 2006), в большинстве проводятся в лабораторных условиях (Wang et al., 2011), а производство стирола представляет собой процесс, технологически отличный от Российского, и не являющийся совместным с производством окиси пропилена (Babaei et al., 2010). СВ совместного ПСОП открытого акционерного общества «Нижекамскнефтехим» (ОАО «НКНХ») были исследованы только физико-химическими методами (Gayazova et al., 2013), или ограничивались интродукцией 1-2 штаммов, выдерживающих экстремально высокие уровни ХПК (Якушева с соавт., 2005). Разработка диссертационной темы начата на основе

предварительных экспериментальных данных, полученных в Казанском университете (Петров, 1995). При проведении лабораторного моделирования ранее использовали неидентифицированные микроорганизмы из различных ниш окружающей среды. В связи с этим остается актуальной задача изучения адаптированных к условиям ПСОП микробных сообществ, а также идентификации доминирующих аэробных бактерий с оценкой их потенциала в биоочистке. Эти исследования играют важную роль в оптимизации работы очистного сооружения и соблюдении экологической безопасности, которые обеспечиваются результатами настоящей работы.

Цель и задачи исследований. Цель данной работы состояла в выявлении вклада микроорганизмов в снижение уровня загрязнения высококонцентрированной СВ совместного ПСОП, основанного на токсикологической характеристике системы очистки СВ, анализе структуры и функций микробного сообщества на последовательных стадиях очистки СВ.

В соответствии с поставленной целью работы решались следующие задачи:

1. Выявить степень токсичности СВ по отношению к растениям (*Secale cereale*, *Pisum sativum*), простейшим (*Paramecium caudatum*) и бактериям, а также оценить генотоксичность СВ в тесте Эймса и ими-тесте;
2. Определить численность аэробных микроорганизмов на различных этапах очистки СВ совместного ПСОП, изолировать культивируемые группы аэробов и создать коллекцию выделенных микроорганизмов;
3. Выявить доминирующие изоляты бактерий в биореакторе очистки СВ совместного ПСОП и определить их видовую принадлежность, используя молекулярные методы;
4. Установить возможность использования основных компонентов СВ (гликоли, МФК, АЦФ, бензол, стирол, фенол, толуол) в качестве единственного источника углерода для роста доминирующих изолятов;
5. Охарактеризовать активность дыхания доминирующих изолятов на двухкомпонентных смесях на основе моноэтиленгликоля (МЭГ) и МПГ с другими компонентами СВ (гликоли, этанол, МФК, АЦФ, бензол, стирол, толуол).

Научная новизна. Результаты диссертационной работы впервые показали принципиальную возможность предварительной биологической очистки высоконагруженной по органике СВ совместного ПСОП. Выявлено, что не только содержание и уровень токсичности компонентов необработанной СВ, но и структура сообщества культивируемых аэробных микроорганизмов определяет возможности биологической очистки данной СВ в биореакторе. Показано, что численность культивируемых аэробных микроорганизмов в биореакторе достигала 6.85×10^8 колониеобразующих единиц/мл (КОЕ/мл) в фазе активной деятельности микробного сообщества. Определено, что доминирующие гетеротрофные изоляты, выделенные из биореактора являются бактериями родов *Citrobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Stenotrophomonas*, *Raoultella*, *Morganella* и *Lysinibacillus*, и могут использовать основные компоненты данной СВ в качестве единственного источника углерода. Установлено, что гликоли и этанол могут стимулировать дыхательную активность микрофлоры биореактора,

и могут применяться в качестве косубстратов, тогда как летучие ароматические соединения оказывают ингибирующее действие на большинство изолятов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы позволяют решить насущные проблемы очистки и обезвреживания экстремально высококонцентрированных и высокотоксичных СВ, включающих экологически опасные соединения. Внедренная в ОАО «НКНХ» технология предобработки промышленной СВ совместного ПСОП обеспечивает снижение суммарной нагрузки по органике до 88%, что дает возможность поступления СВ после предобработки в общезаводскую классическую очистительную систему в аэротенках. Микрофлора биореактора является основой биологической очистки, она играет основную роль в устранении загрязнений, токсичности СВ и преодолении ряда факторов, определяющих неудовлетворительное состояние предобработки. Расшифровка структуры микробного сообщества – это ключ к созданию рациональной и функционально стабильной системы очистки, регулирование которой может осуществляться интродукцией целевых групп бактерий – компонентов сообщества. Таким образом, в случае остановки очистных сооружений или проведения профилактических мер, специалисты будут знать, какие микроорганизмы нужно выращивать в биореакторе, чтобы добиться максимальной эффективности очистки СВ. Кроме того, результаты проведенного ранжирования компонентов СВ совместного ПСОП по степени доступности и токсичности необходимо учитывать при направленном контроле над составом СВ, поступающих на установку предочистки. При этом целесообразно сокращать удельное содержание летучих компонентов, угнетающих рост и дыхательную активность микроорганизмов-деструкторов. Результаты проведенных исследований имеют значимое научное и прикладное значение и могут быть использованы при совершенствовании технологии очистки СВ нефтехимических производств.

Положения, выносимые на защиту:

1. Впервые охарактеризованы численность и таксономическая принадлежность аэробных микроорганизмов сообщества биореактора локальных очистных сооружений предварительной очистки высококонцентрированной нефтехимической СВ совместного ПСОП;

2. Выявлена взаимосвязь между уровнем токсичности компонентов необработанной СВ совместного ПСОП, содержанием аэробных гетеротрофов и эффективностью предочистки в биореакторе, определяемой доминирующими гетеротрофными изолятами родов *Citrobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Stenotrophomonas*, *Morganella*, *Raoultella*, *Lysinibacillus*, *Achromobacter*, *Brevibacterium* и *Kocuria*;

3. В лабораторных условиях установлен синергетический эффект биотрансформации токсичных соединений СВ в двухкомпонентных смесях с использованием легкодоступного субстрата, предложены рекомендации для реализации разработки на локальных очистных сооружениях ПСОП.

Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается большим объемом многократных лабораторных экспериментов, выполненных и анализированных на современных приборах с высокой точностью;

опубликованием полученных данных в международном научном журнале спустя процесса рецензирования ведущими учеными в данной области; сопоставлением с новыми изучениями и апробированием возможности использования полученной коллекции микробного сообщества для очистки реальных СВ в полномасштабной установке в ОАО «НКНХ».

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались на VI международном научном семинаре «Фундаментальные исследования и инновации» и Всероссийском молодежном научном семинаре «Наука и инновации – 2011» (Йошкар-Ола, 2011); IV Международной научно-практической конференции "Европейская наука и технология" (Мюнхен, Германия, 2013); XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2013» (Москва, 2013); XVII Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Москва, 2013); Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Биотехнологии в решении экологических проблем природы, общества и человека в Евразии: взгляд молодых ученых и специалистов» (Казань, 2013); I Международной научной конференции «Глобальная наука и инновация» (Чикаго, США, 2013); X Международной научно-практической конференции «Ключевые аспекты научной деятельности – 2014» (Пшемьсль, Польша, 2014); XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2014» (Москва, 2014); III Всероссийской молодежной научной конференции «Естественнонаучные основы теории и методов защиты окружающей среды» (Санкт-Петербург, 2014); IV конференции молодых специалистов «Инновация и молодежь – два вектора развития отечественной нефтехимии» (Нижнекамск, 2014); VII Международной студенческой научной конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии» (Ульяновск, 2014) и XXIX Международной научной конференции “Research Journal of International Studies” (Екатеринбург, 2014).

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнена в рамках государственной Программы повышения конкурентоспособности Казанского Федерального университета и поддержана соглашением о сотрудничестве с ОАО «НКНХ». Личный вклад автора заключается в формулировке и постановке целей и задач исследований; анализе и переработке данных литературы; выборе методик экспериментов; проведении лабораторных экспериментов; обсуждении, анализе и обобщении полученных результатов и формулировке выводов; непосредственной подготовке материалов для публикаций в международном журнале и в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией РФ; участии в зарубежных, международных и Всероссийских конференциях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 22 работы, из них 1 статья в зарубежном издании, включенном в базу систем цитирования ISI Web of Science и Scopus, 7 статей в Российских изданиях, включенных в список Высшей аттестационной комиссии (ВАК), 14 материалов зарубежных, международных и Всероссийских конференций.

Общая структура диссертации. Диссертация изложена на 146 страницах и состоит из введения, обзора литературы, разделов «Материалы и методы», «Результаты», обсуждения и заключения. Содержит 301 библиографический источник, 15 таблиц и 21 рисунок.

Благодарности. Диссертация посвящается памяти д.б.н., профессора Р.П. Наумовой, которая пробудила у автора интерес к научным исследованиям и являлась организатором совместных работ с объединением «Нижекамскнефтехим».

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю – д.б.н., профессору, академику АН РТ О.Н. Ильинской за внимательное отношение к работе, ценные идеи, плодотворное обсуждение полученных материалов для публикаций и диссертации, и постоянную и неоценимую поддержку на всех этапах работы. Особо автор благодарит д.х.н., профессора В.З. Латыпову за рекомендацию к проведению работ на кафедре микробиологии КФУ, а также сотрудников ИФМиБ КФУ к.б.н., с.н.с. А.И. Колпакова, к.б.н., доцента Н.С. Карамову, к.б.н. Т.В. Григорьеву, к.х.н. А.В. Гарусова, к.б.н., доцента П.В. Зеленихина, к.б.н., доцента А.М. Зиганшина, к.б.н. И.В. Хилия, к.б.н. А.А. Несмелова, аспирантов А.В. Лайкова, А.В. Макееву и Р.М. Девятярова. Автор признателен аспиранту кафедры ТСК ФГБОУ ВПО «КНИТУ» Нго Куен Куи за ценную помощь в проведении экспериментов и сотрудникам ОАО «Нижекамскнефтехим» – к.б.н. О.И. Якушевой, Ф.М. Идрисовой и В.Н. Никоноровой за предоставление проб и плодотворное сотрудничество. Искренняя благодарность всем сотрудникам кафедры микробиологии КФУ за помощь в организации экспериментов и доброжелательную рабочую атмосферу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования, отбор и подготовка проб. В работе использовали пробы СВ совместного ПСОП при поступлении в биореактор, суспендированные и иммобилизованные микроорганизмы из биореактора, а также очищенные СВ на выходе из него. Суспендированные пробы отбирали асептично в темные стеклянные бутылки объемом 1л, а иммобилизующий материал извлекли после остановки биореактора на профилактику и доставляли на кафедру микробиологии Казанского федерального университета и хранили при 4°C. Анализ проводили в течение 24ч.

Химические методы анализа. Содержание и концентрацию компонентов СВ определяли методами газовой хроматографии (Кристалл-2000, ПИД-ЭЗД-ПФДС/Ф, колонка SE-54 (CP-Sil 8CB-50м), газ-носитель гелий, температура детектора 300°C, испарителя – 240°C) и хромато-масс-спектрометрии (MD-800, фирма Fisons, колонка Wax 52), а также газового хроматографа «Маэстро GX 7820» с использованием колонки 19091N-233 HP-INNOWAX (30м × 0.25 мм × 0.50 μм) и методом ИК Фурье-спектрометрии в интервале 500-4000 см⁻¹ в жидкой пленке (ИК-Фурье спектрометр VECTOR 33, фирма Bruker). Величины ХПК СВ измеряли бихроматным методом (ГОСТ Р 52708–2007). Значения pH определяли потенциометрическим способом. Значения биологического потребления кислорода

(БПК) определяли стандартным скляночным методом (Лурье, 1984; ГОСТ 27065–86). Химический анализ проводили для СВ на входе и выходе из биореактора.

Токсикологические методы анализа. Степень токсичности СВ оценивали с помощью биотестов на зоо- и фитотоксичность (Наумова с соавт., 2004), а также токсичности по отношению к тестерному штамму *Salmonella typhimurium* TA98 (Ильинская с соавт., 2012). Мутагенный потенциал СВ определяли с помощью теста Эймса (Ильинская с соавт., 2012) и umu-теста (Mersch-Sundermann et al., 1991).

Микробиологические методы анализа. Пробы суспендированных и иммобилизованных микроорганизмов высевали на различные питательные среды – МПА, МПА с добавлением 5% NaCl, Кинга Б, Гаузе №1, Сабуро, Эшби и Чапека-Докса. Учет колоний проводили спустя 3-7 суток культивирования, определяли тип окраски по Граму и подвижность культур (Теппер с соавт., 1993; Нетрусов с соавт., 2005).

Молекулярно-генетические анализы. Идентификацию доминирующих изолятов из микробного сообщества проводили с помощью анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рибосомной рибонуклеиновой кислоты (рРНК) (Maloy, 1989; Weisburg et al., 1991; Hall, 1999) и масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF MS) (Mount, 2004; Fox, 2006; Mellmann et al., 2008).

Методы анализа биodeградационного потенциала. Способность отдельных доминирующих штаммов к биodeградации основных компонентов СВ совместного ПСОП определяли по их росту в жидкой среде, используя один из основных компонентов данной СВ в качестве единственного источника углерода. Способность доминирующих штаммов к совместной биodeградации основных компонентов СВ совместного ПСОП оценивали в модельном биореакторе. Дыхательную активность доминирующих изолятов бактерий определяли по выделению углекислого газа на газовом хроматографе Clarus-580.

Обработка экспериментальных данных, а также оценка значимости полученных результатов были выполнены с помощью стандартных методов математической статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Снижение уровня загрязнения высококонцентрированной сточной воды совместного производства стирола с окисью пропилена

Необработанная СВ характеризуется высокой щелочностью и высокой концентрированностью: значения ее pH варьировали от 9.95 до 11.95, тогда как нагрузка по ХПК варьировала от 4173.0 до 15727.5 мг/л (Таблица 1), что значительно превышает нагрузку по ХПК бытовых СВ, которая колеблется в пределах 150-600 мг/л (Воронов, Яковлев, 2006). Нагрузка по ХПК низкозагрязненных промышленных СВ составляет меньше 1000 мг/л и высокозагрязненных вод – более 4000 мг/л (Leslie Grady Jr. et al., 1999; Chan et al., 2009). Следовательно, нефтехимическая СВ совместного ПСОП характеризуется высокой загрязненностью. За период исследований (34 месяца) на предприятии 3

раза обновляли сообщество в биореакторе, в соответствии с 3 летними остановками биореактора. В течение одной замены микробного сообщества развитие сообщества микроорганизмов проходило 3 фазы: I фаза (адаптационная фаза) – начальная фаза после запуска биореактора, II фаза – фаза формирования сообщества микроорганизмов в биореакторе и III фаза – фаза активной деятельности микробного сообщества.

Таблица 1. Снижение ХПК после процесса предочистки в биореакторе

Фаза	Число замен микробного сообщества в биореакторе					
	1		2		3	
	Снижение ХПК, %*	ХПК поступающей СВ, мг/л	Снижение ХПК, %	ХПК поступающей СВ, мг/л	Снижение ХПК, %	ХПК поступающей СВ, мг/л
I	26.32	11067.50	11.56	8010.90	40.00	8334.40
	29.55 (а)	8201.60 (а)	38.89	11193.70	38.10	11786.30
II	45.45	6634.40	51.77	7879.00	56.25	9650.00
	50.00 (а, б)	7237.50 (а, б)	53.84	7783.70	52.63	10663.70
	57.14	8155.00	48.15	15727.50	50.01	6031.30
III	68.28	10135.00	66.26	7211.00	54.55	13681.30
	81.58 (а)	7296.00 (а)	65.63	5965.00	64.71	10571.90
	88.46	8399.00	73.69	11125.00	70.00	12437.50
	78.84 (г)	9740.00 (г)	76.81	6706.00	71.68 (б, в)	4173.00 (б, в)

* За 100% принято ХПК поступающей СВ; а – точка отбора проб СВ для оценки токсичности и анализа структуры микробного сообщества; б – точка отбора проб СВ для оценки генотоксичности; в – точка отбора проб СВ для модельного биореактора; г – точка отбора иммобилизующего материала и оценки дыхательной активности микробного сообщества в биореакторе на двухкомпонентных смесях.

В I фазе эффективность предварительной очистки была низкая. Снижение ХПК достигало максимального значения в III фазе, и составляло от 55% до 88% при начальных значениях ХПК 13681.3 и 8399.0 мг/л, соответственно (Таблица 1).

Биоразлагаемость органики отражена соотношением ХПК и БПК за 5 суток инкубации (БПК₅), если это соотношение варьирует от 1:30 до 2.50:1, то компоненты СВ легко подвергаются биологическому разложению (Jern, 2005). В СВ совместного ПСОП соотношение ХПК:БПК₅ варьировало от 1.50:1–2.25:1, что позволяло осуществлять предочистку биологическим методом в биореакторе.

Основными компонентами СВ совместного ПСОП являются гликоли (МПГ, ДПГ, МЭГ, диэтиленгликоль (ДЭГ)) и летучие соединения (МФК, АЦФ, стирол, бензол, толуол, этанол, фенол). Все эти соединения биodeградируемые (Van Hamme et al., 2003). Среди них МПГ и МЭГ могут разлагаться различными почвенными и водными микроорганизмами (Farzadkia et al., 2010). Эффективность их трансформации в течение процесса предочистки СВ совместного ПСОП на локальных сооружениях ОАО «НКНХ» отражена на рисунке 1.

Эффективность удаления МПГ, МЭГ и этанола достигала 100% во всех фазах развития микробного сообщества в биореакторе. АЦФ был не только трудно

разлагаемым, но и увеличил свою концентрацию в конце процесса предварительной очистки в I и II фазах за счет образования в качестве промежуточного метаболита при деградации других компонентов СВ. Эффективность его удаления была относительно высока только в III фазе.

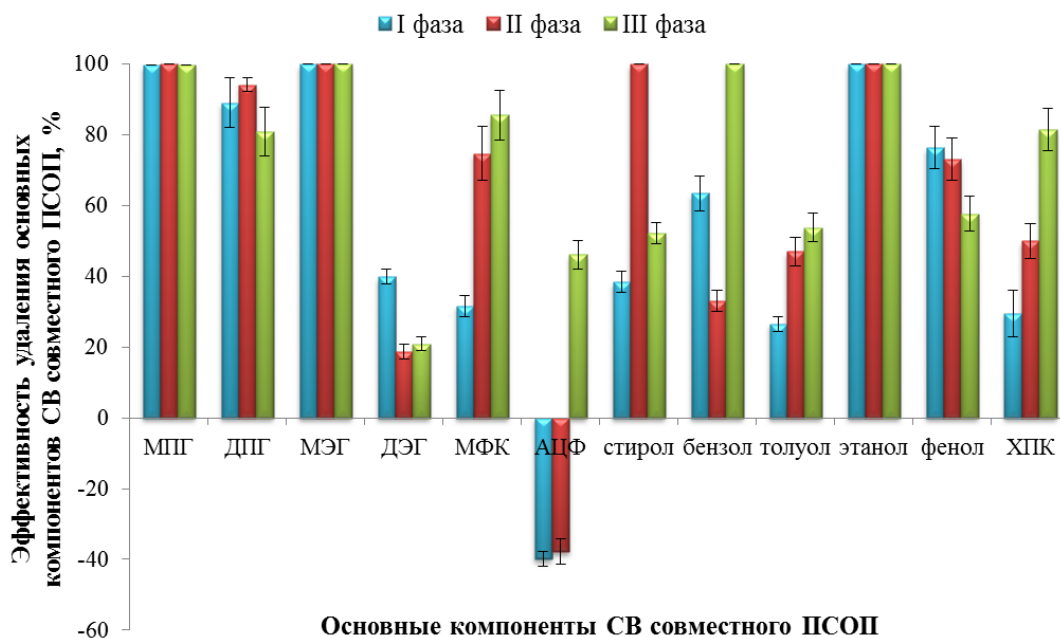


Рисунок 1. Эффективность удаления основных компонентов СВ совместного ПСОП за 100% принято полное удаление компонентов в биореакторе

Процентное соотношение основных компонентов в необработанной СВ в каждой из трех фаз представлено на рисунке 2.

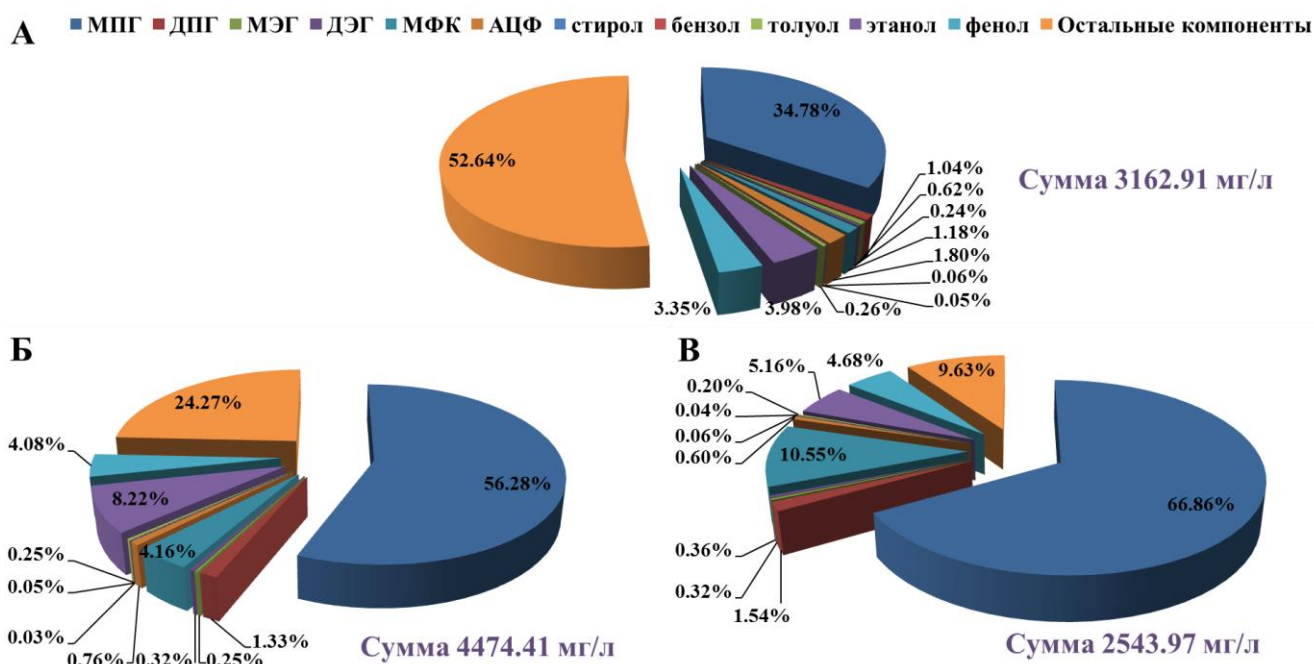


Рисунок 2. Процентное соотношение основных компонентов в составе необработанной СВ (А) I фазы, (Б) II фазы и (В) III фазы развития микробного сообщества в биореакторе

Из рисунка 2 видно, что в II и III фазах развития микробного сообщества в биореакторе большую часть необработанной СВ составлял МПГ, тогда как в I фазе его доля была намного меньше.

2. Оценка токсичности и генотоксичности сточной воды совместного производства стирола с окисью пропилена

2.1. Степень токсичности сточной воды по отношению к простейшим (*Paramecium caudatum*)

При контакте с неразбавленной СВ наблюдали гибель всех особей инфузорий, что говорит о 100% токсичности, при этом показатель БКР₁₀₋₁ варьировал в пределах от 7.91 до 9.45 (Рисунок 3), БКР₁₀₋₁ обработанной СВ варьировал от 2.78 до 6.14.

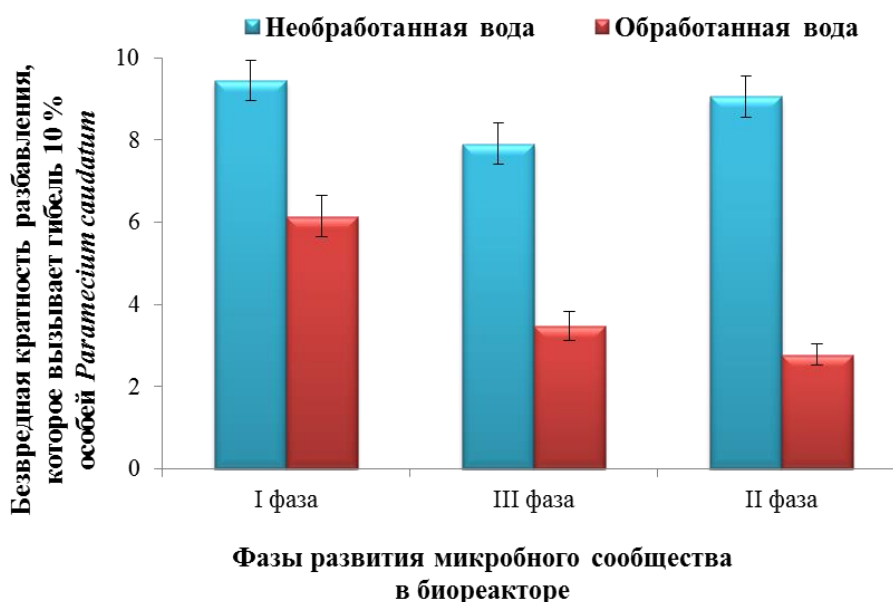


Рисунок 3. Безвредная кратность разбавления, которое вызывает гибель 10% особей *Paramecium caudatum* после 1 часовой экспозиции

Установлено, что предобработка СВ совместного ПСОП в биореакторе снижала показатель разбавления в интервале от 1.5 до 3.3 раз. С переходом микробного сообщества в биореакторе от I до III фазы зоотоксичность значительно снижалась.

2.2. Токсичность сточной воды по отношению к растениям (*Secale cereale* и *Pisum sativum*)

Фитотоксичность поступающей СВ по отношению ко ржи варьировала от 60% до 100% и по отношению к гороху – от 50% до 70 %. Несмотря на высокую нагрузку данной СВ, локальная предобработка в биореакторе позволяет снизить токсичность в среднем в 2 раза (Рисунок 4).

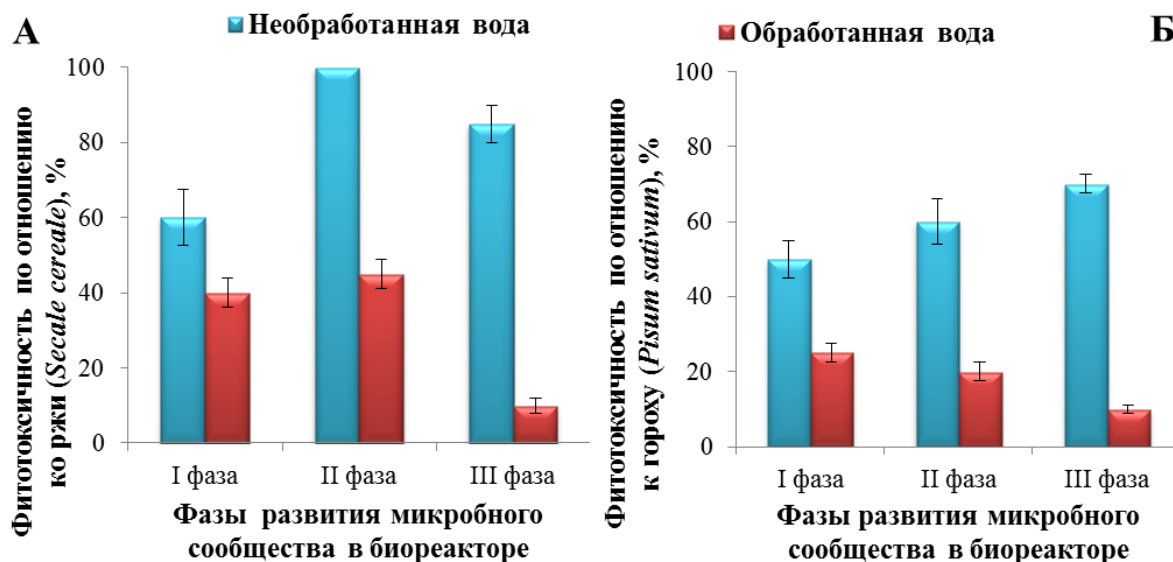


Рисунок 4. Динамика снижения фитотоксичности по отношению к *Secale cereale* (А) и *Pisum sativum* (Б)

2.3. Оценка генотоксичности сточных вод

Тест на токсичность по отношению к тестерному штамму *Salmonella typhimurium* TA98 и тест Эймса. При проведении теста на токсичность по отношению к тестерному штамму *S. typhimurium* TA98 наблюдали слабую токсическую активность данной поступающей СВ, СВ в биореакторе и обработанной воды после биореактора. Процент выживания штамма составлял от 51% до 96% для всех изучаемых проб, что означает допустимость исследований данных проб СВ на мутагенность.

Число колоний-ревертантов в опытах превышает негативный контроль не более чем в 2 раза. Следовательно, можно сделать заключение об отсутствии мутагенной активности данной поступающей СВ, а также СВ в биореакторе и на выходе из него в II и III фазах развития микробного сообщества в биореакторе. Хотя среди компонентов СВ совместного ПСОП есть известные мутагены, их потенциал проявляется в основном при их растворении в органических растворителях, например диметилсульфоксиде (Ohe et al., 2004). Анализ СВ, то есть водного раствора соединений, показал незначительную генотоксичность СВ, не оказывающую значимого влияния на микрофлору реактора.

Umu-тест

Поступающая СВ вызывала повышение активности β -галактозидазы у штамма *S. typhimurium* TA1535/pKK1002, что свидетельствует об активации SOS-оперона при повреждениях ДНК. Фактор индукции SOS ответа IF составлял 2.19 (>2) в III фазе развития микробного сообщества биореактора. Поскольку состав необработанной СВ маловариабелен, для I и II фаз ДНК-повреждающий эффект будет аналогичным. Таким образом, можно сделать вывод о наличии слабого генотоксического действия поступающей СВ совместного ПСОП предприятия ОАО «НКНХ».

3. Определение численности аэробных микроорганизмов на различных этапах очистки сточной воды

Как правило, в поступающей СВ отсутствует микрофлора; в пробе СВ биореактора взвешенные аэробные микроорганизмы составляют 10^7 – 10^8 КОЕ/мл. Среди полученных изолятов подавляющее большинство составили аэробные гетеротрофные бактерии, среди которых 2 изолята образовывали зеленый пигмент на среде Кинга Б. В качестве минорных изолятов получены 3 осмоотолерантных штамма бактерий (на среде МПА + 5% NaCl), 3 изолята дрожжей (Рисунок 5А) и 3 изолята микромицетов (Рисунок 5Б). Микромицеты были обнаружены при посеве пробы иммобилизованной микрофлоры, и не характерны для сообщества взвешенной микрофлоры. Также было выделено 3 изолята предполагаемых азотфиксаторов.



Рисунок 5. Фотографии дрожжей (А) и микромицетов (Б), выделенных из биореактора локальных сооружений предочистки СВ совместного ПСОП

Актинобактерии на среде Гаузе выделены не были. Количество аэробных гетеротрофов (10^7 – 10^8 КОЕ/мл) намного превышает численность других физиологических групп (10^5 – 10^6 КОЕ/мл) во всех фазах развития микробного сообщества в биореакторе (Рисунок 6), вследствие чего другие группы не были предметом отдельного изучения.

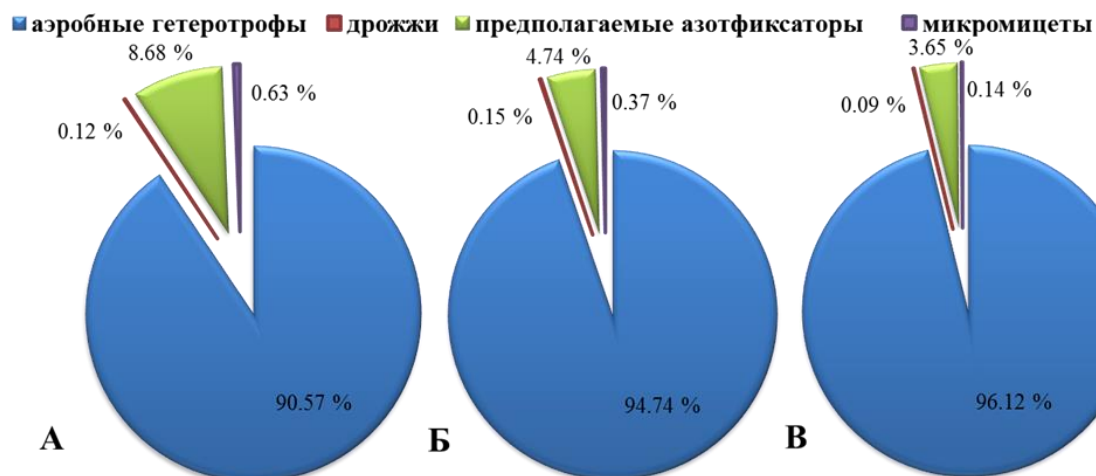


Рисунок 6. Доля аэробных микроорганизмов в биореакторе в (А) I фазе (8.06×10^7 КОЕ/мл), (Б) II фазе (1.90×10^8 КОЕ/мл) и (В) III фазе (6.85×10^8 КОЕ/мл) развития микробного сообщества

Численность аэробных микроорганизмов в сообществе биореактора увеличивалась от I до III фазы развития микробного сообщества. Микробное сообщество биореактора претерпевает динамические изменения в зависимости от фазы его развития, однако численность и состав микроорганизмов варьирует в пределах одного порядка.

4. Выявление доминирующих изолятов бактерий в биореакторе очистки сточной воды и определение их видовой принадлежности

Нами были определены основные культивируемые изоляты, имеющие высокую численность в биореакторе. Филогенетический анализ выявил 16 доминирующих изолятов бактерий, родовая и видовая принадлежность которых представлена на рисунке 7. По масс-спектрометрическому анализу (MALDI-TOF MS) эти штаммы достоверно подтвердили свою родовую и видовую принадлежность. Доминирующие изоляты, вносящие основной вклад в очистку СВ совместного ПСОП, относились к *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*proteobacteria, *Bacilli* и *Actinobacteria*. Wagner и Loy (2002) показали, что филум *Proteobacteria* в основном ответственен за удаление из СВ органических веществ, таких как азот, фосфор и ароматические соединения (Wagner, Loy, 2002).

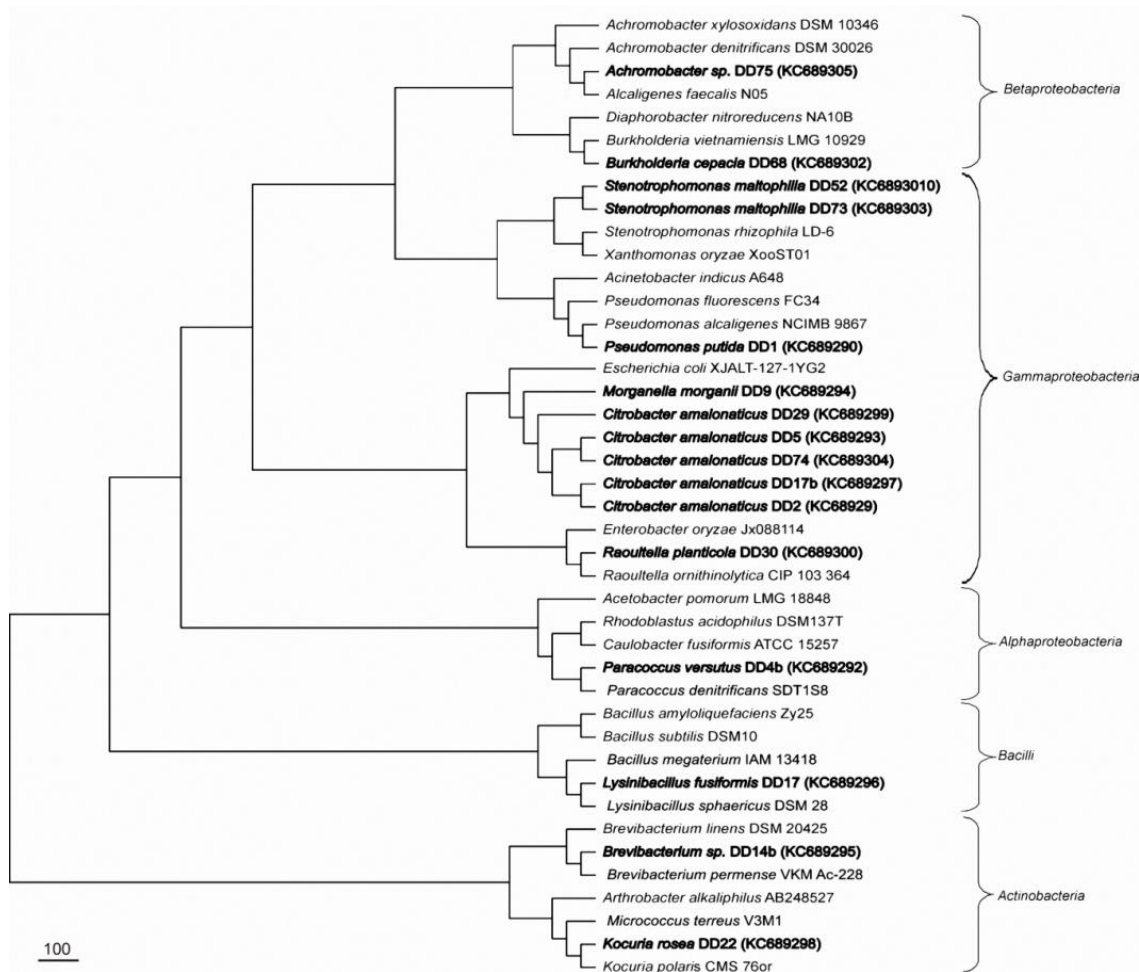


Рисунок 7. Филогенетическое дерево генов 16S рРНК, демонстрирующее таксономическую принадлежность выделенных штаммов бактерий

Доля доминирующих изолятов несколько варьирует в зависимости от фазы развития микробного сообщества, начального ХПК и состава необработанной СВ совместного ПСОП. В основном в биореакторе присутствуют бактерии родов *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Lysinibacillus*, *Morganella*, *Raoultella* и *Stenotrophomonas*.

Штамм *Citrobacter amalonaticus* DD2 встречается в биореакторе в количестве 6-15% от общего количества суспендированных аэробных культивируемых гетеротрофов, тогда как *Pseudomonas putida* DD1 – 5÷12%, *Burkholderia cepacia* DD68 – 4÷7%, *Paracoccus versutus* DD4b – 3÷9%, *Lysinibacillus fusiformis* DD17 – 3÷12%, *Raoultella planticola* DD30 – 4÷7%, *Morganella morganii* DD9 – 5÷7%, *Brevibacterium* sp. DD14b – 3÷8%, *C. amalonaticus* DD74 – 4÷8%, *C. amalonaticus* DD29 – 4÷9%, *Stenotrophomonas maltophilia* DD52 – 4÷10%, *C. amalonaticus* DD17b – 4÷8%, *C. amalonaticus* DD5 – 2÷6%, *Stenotrophomonas maltophilia* DD73 – 0÷6%, *Achromobacter* sp. DD75 – 1÷3%, *Kocuria rosea* DD22 – 0÷3% (Рисунок 8А, Б, В).

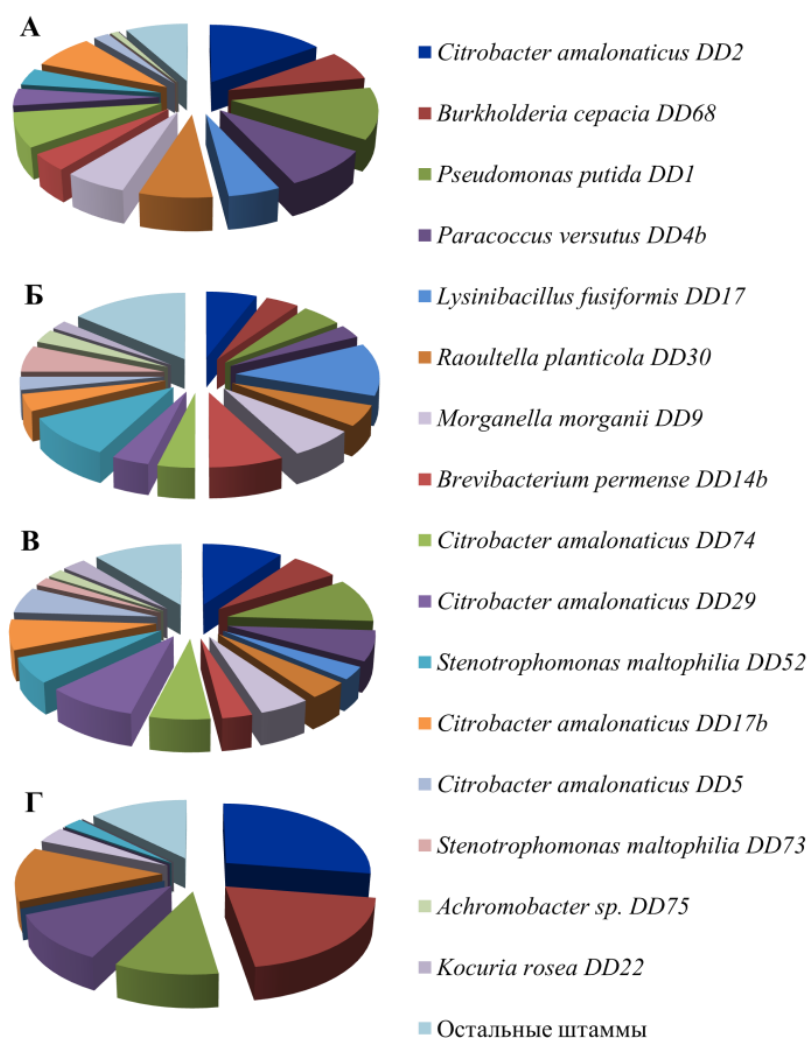


Рисунок 8. Доля суспендированных (А, Б, В) и иммобилизованных (Г) культивируемых аэробных гетеротрофных бактерий в биореакторе в (А) I фазе (0.73×10^8 КОЕ/мл), (Б) II фазе (1.80×10^8 КОЕ/мл), (В) III фазе (6.58×10^8 КОЕ/мл) и (Г) III фазе (4.00×10^{11} КОЕ/г) развития микробного сообщества. Редкие штаммы с долей менее чем 1% сгруппированы как «Остальные штаммы»

Иммобилизованная микрофлора также включает ряд доминирующих изолятов, сходных с суспендированной микрофлорой, а именно *C. amalonaticus* DD2 (27.5%), *B. cepacia* DD68 (20%), *R. planticola* DD30 (12.5%), *P. versutus* DD4b (11.25%), *P. putida* DD1 (10%), *M. morganii* DD9 (3.75%) и *S. maltophilia* DD52 (2.5%) (Рисунок 8Г). Отметим, что доля первых четырех изолятов значительно выше, чем в составе суспендированной микрофлоры.

Родовая и видовая принадлежность минорных штаммов, составляющих менее 1% от общего количества аэробных гетеротрофов биореактора, представлена в таблице 2.

Таблица 2. Идентификация минорных изолятов в биореакторе (MALDI-TOF MS)

Штамм	Название	Уровень достоверности	Символы
DD12	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.32	+++
DD21	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.333	+++
DD27	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2.389	+++
DD47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.493	+++
DD49	<i>Micrococcus luteus</i>	2.4	+++
DD58	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2.352	+++
DD2b	<i>Serratia liquefaciens</i>	2.432	+++
DD5b	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2.312	+++
DD19b	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.422	+++
DD6c	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.408	+++
DD9c	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2.313	+++
DD13	<i>Bacillus cereus</i>	2.115	++
DD10	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2.233	++
DD16	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	2.177	++
DD32	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2.233	++
DD40	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	2.041	++
DD44	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2.209	++
DD51	<i>Kerstersia gyiorum</i>	2.23	++
DD54	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2.079	++
DD70	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.204	++
DD3b	<i>Alcaligenes faecalis</i>	2.229	++
DD21b	<i>Brevundimonas diminuta</i>	2.251	++
DD1c	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2.048	++
DD5c	<i>Aeromonas media</i>	2.164	++
DD7c	<i>Aeromonas caviae</i>	2.26	++
DD6'	<i>Enterobacter asburiae</i>	2.165	++
DD11b	<i>Comamonas terrigena</i>	1.977	+
DD3c	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	1.979	+
DD53	<i>Achromobacter ruhlandii</i>	1.933	+
DD71	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1.977	+
DD4c	<i>Achromobacter denitrificans</i>	1.852	+
DD4'	<i>Achromobacter denitrificans</i>	1.979	+

5. Использование основных компонентов сточной воды в качестве субстратов для роста доминирующих изолятов

5.1. Использование основных компонентов сточной воды в качестве единственного источника углерода

В данном исследовании мы показали распределение метаболической активности доминирующих культивируемых изолятов по отношению к основным компонентам СВ (Таблица 3). Показано, что оптимальными концентрациями основных компонентов СВ совместного ПСОП для роста изученных изолятов являлись 10 г/л МПГ, 10 г/л ДПГ, 2 г/л МЭГ, 2 г/л ДЭГ, 1 г/л летучих соединений (бензол, толуол, стирол, МФК, АЦФ, фенол).

Таблица 3. Метаболический потенциал доминирующих изолятов по отношению к основным компонентам СВ совместного ПСОП *

Доминирующие изоляты	МПГ	ДПГ	МЭГ	ДЭГ	бензол	толуол	стирол	МФК	АЦФ	фенол	П
<i>Pseudomonas putida</i> DD1	++	++	++	+	–	–	+	–	–	+	++
<i>Burkholderia cepacia</i> DD68	+	+	+	+	–	–	+	+	–	++	+
<i>Citrobacter amalonaticus</i> DD2	++	+	+	+	–	–	–	–	–	+	+
<i>Paracoccus versutus</i> DD4b	++	+	++	+	–	–	–	–	–	+	–
<i>Citrobacter amalonaticus</i> DD5	+	+	++	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Citrobacter amalonaticus</i> DD17b	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> DD17	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>Raoultella planticola</i> DD30	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	+
<i>Morganella morganii</i> DD9	++	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DD52	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–

* П, поступающая СВ; –, видимого роста не обнаружено (оптическая плотность при длине волны 600нм (OD_{600}) < 0.1); +, слабый рост (OD_{600} = 0.1–1); ++, интенсивный рост (OD_{600} > 1).

Далее рассматривали только оптимальные концентрации. Важно, что почти все доминирующие изоляты могут расти, пусть и незначительно, на необработанной СВ. Большинство изученных штаммов показало более высокий рост на МПГ, МЭГ и ДПГ, чем на ДЭГ или ароматических соединениях. Почти никто из изученных бактерий не мог расти на ароматических соединениях. Однако штамм *C. amalonaticus* DD2 показал небольшой рост на феноле, *P. putida* DD1 – на стироле и феноле, *P. versutus* DD4b – на феноле. Штамм *B. cepacia* DD68 не показал роста на ароматических соединениях, таких как бензол, толуол, АЦФ, однако рос на стироле, МФК и феноле. Бактерии родов *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Paracoccus* и *Citrobacter* продемонстрировали относительно высокий уровень роста. Отметим, что существуют различия в метаболической

активности внутри одного вида, как можно наблюдать у различных штаммов *S. amalonaticus* (Таблица 3).

Изменение оптической плотности при выращивании 10 отдельных исследуемых изолятов на жидкой минеральной среде с добавлением одного из перечисленных ксенобиотиков или самой СВ позволило выявить закономерность снижения биодоступности загрязнений в ряду: МПГ, МЭГ, ДПГ, ДЭГ, поступающая СВ, фенол, стирол, МФК, АЦФ, толуол и бензол.

На основе данных газовой хроматографии показано, что пики поглощения этанола выходят при времени удерживания 3.445 мин, тогда как пики поглощения этилбензола выходят при времени удерживания 9.583 мин, стирола – от 11.929 до 12.104 мин, МПГ – 17.073 мин, АЦФ – от 17.891 до 18.092 мин, МФК – от 19.708 до 19.804 мин и фенола – от 20.802 до 21.900 мин. Эти результаты были использованы для расчета убыли исследуемых субстратов, представленной в таблице 4. Исходные данные по убыли пиков приведены только для фенола (Рисунок 9), аналогичные исходные данные по другим субстратам не представлены.

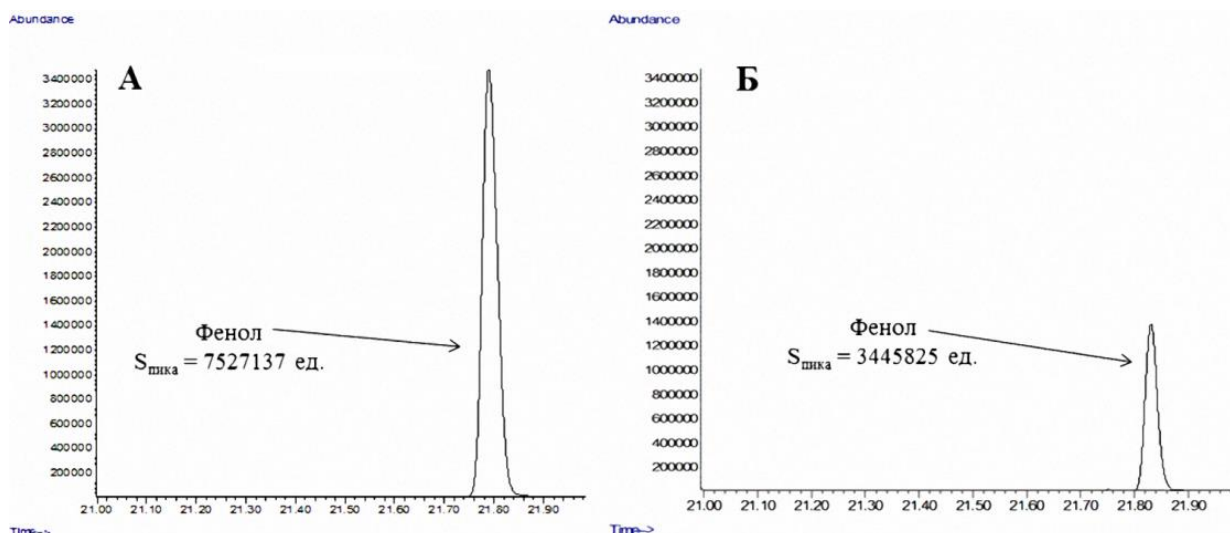


Рисунок 9. Снижение концентрации фенола в случае единственного источника углерода штаммом *Pseudomonas putida* DD1 в начале (А) и после 9 суток (Б) культивирования

При выращивании штамма *P. putida* DD1 на необработанной СВ с добавлением биогенных элементов, эффективность удаления АЦФ и фенола за 15 суток достигала 37% и 46%, соответственно. В случае, когда фенол являлся единственным источником углерода для этого штамма, концентрация фенола уменьшалась на 54% за 9 суток (Рисунок 9), а концентрация стирола за такое же время снижалась на 82% (Таблица 4).

Штамм *B. cerasia* DD68 мог расти на поступающей СВ и удалял этилбензол на 89% за 9 суток, тогда как концентрация фенола, АЦФ и стирола за это время снижалась на 67%, 93% и 94%, соответственно. Если МФК являлся единственным источником углерода, то его концентрация снижалась на 15% за 9 суток, тогда как концентрации стирола и фенола за 15 суток снижались на 18% и 96%, соответственно (Таблица 4).

Штамм *C. amalonaticus* DD2 при выращивании на минеральной среде с добавлением СВ за 9 суток деградировал АЦФ и фенол на 95% и 96%, соответственно. В начале исследуемого периода обнаруживали этанол, площадь пика которого составляла 2053865 ед., однако в дальнейшем этанол полностью использовался бактериями, то есть, эффективность удаления этанола достигала 100%. Когда фенол являлся единственным источником углерода для штамма *P. versutus* DD4b, то его концентрация уменьшалась на 61% за 15 суток (Таблица 4).

Таблица 4. Снижение концентраций компонентов СВ совместного ПСОП по данным газовой хроматографии *

Штамм	Образец	Компоненты	Площадь пика, ед.		Эффективность очистки	Время культивирования
			Исходное содержание	Конечное содержание		
<i>Pseudomonas putida</i> DD1	П	АЦФ	32539	20363	37%	15 суток
		фенол	208474	112079	46%	
	стирол		186227	33497	82%	9 суток
	фенол		7527137	3445825	54%	9 суток
<i>Burkholderia cepacia</i> DD68	П	этилбензол	43109	4605	89%	9 суток
		стирол	266350	16122	94%	
		АЦФ	69668	4916	93%	
		фенол	175048	57429	67%	
	стирол		134485	110470	18%	15 суток
	МФК		7732896	6557401	15%	9 суток
	фенол		4974440	220284	96%	15 суток
<i>Citrobacter amalonaticus</i> DD2	П	АЦФ	747189	37411	95%	9 суток
		фенол	2250623	90692	96%	
		этанол	2053865	0	100%	
	фенол		5217223	1343874	74%	15 суток
<i>Paracoccus versutus</i> DD4b	фенол		10974638	4232280	61%	15 суток

* П – поступающая СВ

5.2. Биodeградация основных компонентов сточной воды комбинированным сообществом доминирующих изолятов

Для оценки способности сообщества к биodeградации компонентов СВ совместного ПСОП было составлено модельное сообщество, скомбинированное из 10 доминирующих изолятов – *Pseudomonas putida* DD1, *Burkholderia cepacia* DD68, *Citrobacter amalonaticus* DD2, *Paracoccus versutus* DD4b, *Citrobacter amalonaticus* DD5, *Citrobacter amalonaticus* DD17b, *Lysinibacillus fusiformis* DD17, *Raoultella planticola* DD30, *Morganella morganii* DD9 и *Stenotrophomonas maltophilia* DD52 (каждый в объеме 25 мл с OD₆₀₀ не менее 1). За 18 суток значение OD₆₀₀ суспензии в модельном биореакторе достигало 1.58 ед. Значение pH за 18 суток проведения эксперимента в биореакторе варьировало от 6.8 до 8.0. За 10 суток сообщество доминирующих изолятов эффективно удаляло 69% фенола и 25% МФК (рис. 10 А, Б). Снижение МФК достигало 86% за 12 суток (Рисунок 10А, В), 92% за 15 суток (Рисунок 10А, Г) и 91% за 18 суток (Рисунок 10А, Д).

После 10 суток фенола на выходе из биореактора обнаружено не было. То есть, фенол полностью удалялся из биореактора за счет деструктивной активности доминирующих изолятов. Аналогичные данные получены для МПГ.

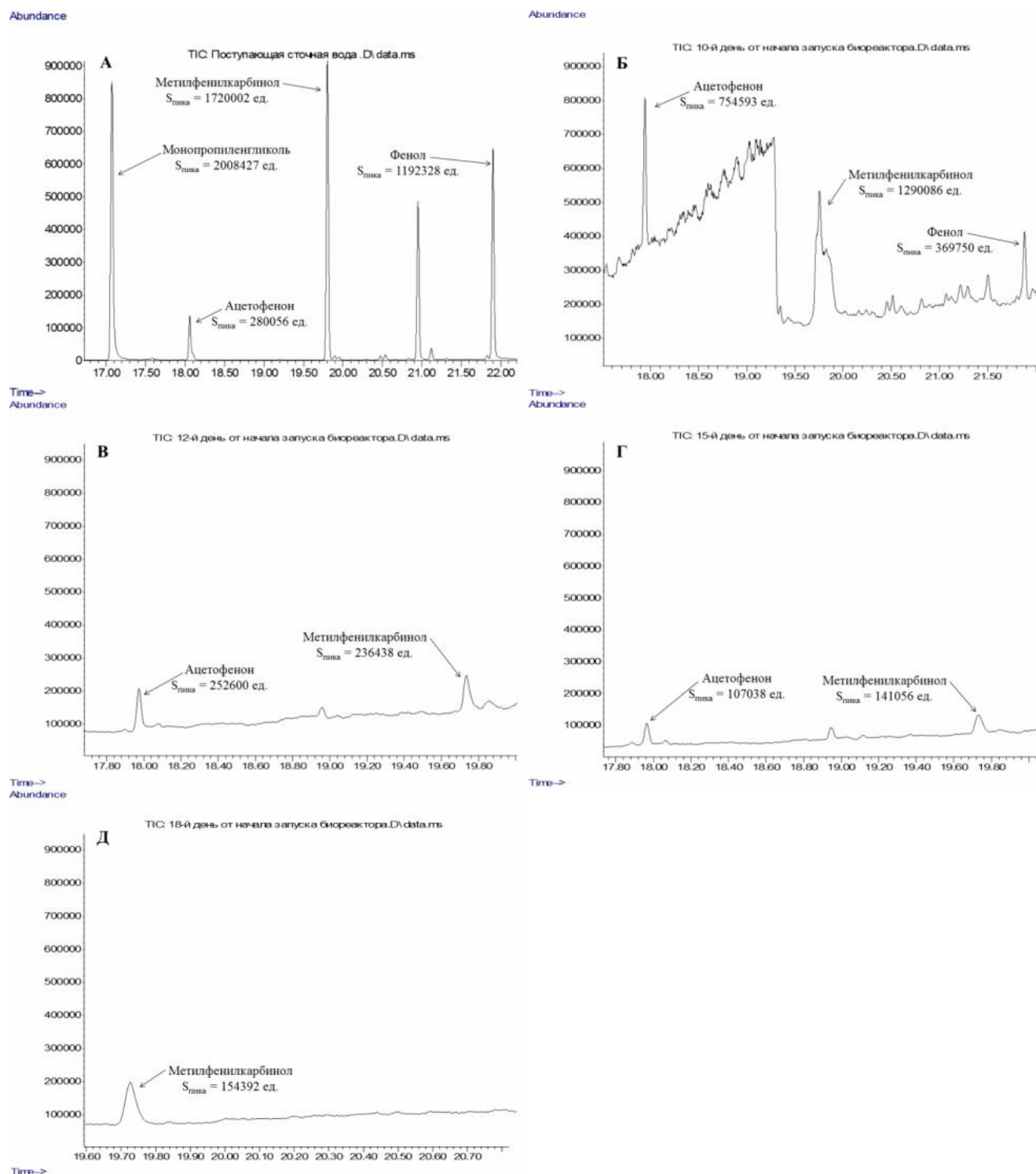


Рисунок 10. Снижение комбинированным сообществом концентрации МПГ, АЦФ, МФК и фенола, содержащихся в необработанной СВ совместного ПСОП

(А) – состав поступающей СВ; (Б) – состав СВ на выходе из биореактора за 10 суток, (В) – 12 суток, (Г) – 15 суток и (Д) – 18 суток

За первые 10 суток концентрация АЦФ увеличивалась в 2.69 раз (Рисунок 10А, Б), что отражает способность микроорганизмов образовывать его в качестве

промежуточного метаболита при деградации других компонентов СВ. В следующие 2 дня эффективность удаления АЦФ составила 10%, а за 15 суток достигала 62%.

Процесс очистки в модельном биореакторе с использованием 10 доминирующих штаммов был проведен для изучения эффективности совместной деградации основных компонентов СВ совместного ПСОП, таких как МПГ, МФК, АЦФ и фенол. Сравнительные результаты эффективности процесса очистки на локальных сооружениях предприятия ОАО «НКНХ» и в модельном биореакторе представлены на рисунке 11.

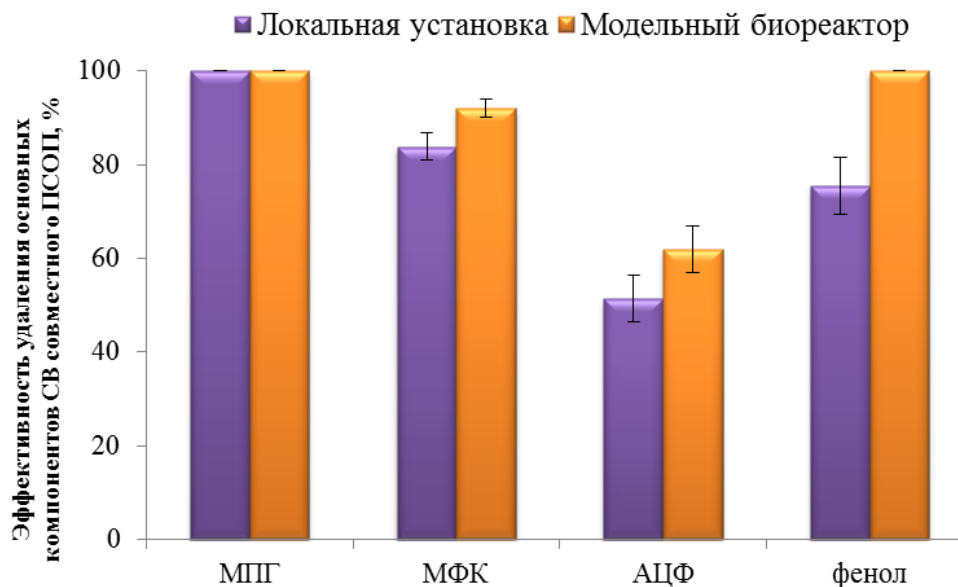


Рисунок 11. Эффективность удаления основных компонентов СВ совместного ПСОП в условиях локальных сооружений и модельного биореактора

Из рисунка 11 видно, что снижение концентрации основных компонентов СВ совместного ПСОП в модельном биореакторе было выше, чем в локальных сооружениях. В случае модельного биореактора доминирующие изоляты предварительно выращивали на 10 г/л МПГ в жидкой минеральной среде с добавлением биогенных элементов в течение 5-и суток, а только после этого их вносили в биореактор с реальной СВ, тогда как в условиях локальных сооружений микрофлору стимулировали непосредственным внесением в биореактор дрожжевого экстракта. Выращивание комбинированного сообщества изолятов на МПГ, служащего косубстратом в системе очистки, не вызывает стресса при переносе в биореактор, поскольку в реальной СВ присутствует значительное количество МПГ. Кроме того, 10 г/л является оптимальной концентрацией МПГ для доминирующих изолятов, выделенных из биореактора. В модельном биореакторе данные доминирующие изоляты адаптируются к СВ с одинаковой нагрузкой ХПК в течение длительного времени (18 суток), тогда как нагрузка по ХПК в полномасштабном биореакторе постоянно изменяется. Указанные причины обуславливают более эффективную работу доминирующих изолятов в модельном биореакторе.

6. Дыхательная активность доминирующих изолятов на двухкомпонентных смесях

6.1. Дыхательная активность доминирующих изолятов на двухкомпонентных смесях на основе моноэтиленгликоля

Была определена скорость выделения углекислого газа доминирующими штаммами при предварительном росте на МЭГ и окислении бинарных смесей спустя 12ч роста (Рисунок 12).

При исследовании активности дыхания микроорганизмов на двухкомпонентных смесях на основе МЭГ установлено, что гликоли оказывали стимулирующее действие на микрофлору биореактора, увеличивая интенсивность дыхания на 22-54%, в особенности МПГ (на 474.8%), и могут применяться в качестве косубстратов, тогда как летучие ароматические соединения, в особенности стирол и АЦФ, ингибируют дыхательную активность большинства изолятов на 28-98%. В случае штаммов *Morganella morganii* DD9 и *Citrobacter amalonaticus* DD5 не было обнаружено синергетического эффекта двухкомпонентных смесей на основе МЭГ.

6.2. Дыхательная активность доминирующих изолятов на двухкомпонентных смесях на основе монопропиленгликоля

Была определена скорость выделения углекислого газа доминирующими штаммами при предварительном росте на МПГ и окислении бинарных смесей спустя 12ч роста (Рисунок 13).

При исследовании активности дыхания микроорганизмов на двухкомпонентных смесях на основе МПГ установлено, что этанол оказывал стимулирующее действие на микрофлору биореактора, увеличивая интенсивность дыхания на 15-28%, и может применяться в качестве косубстрата, тогда как летучие ароматические соединения, в особенности стирол, ингибируют дыхательную активность большинства изолятов на 24-99%.

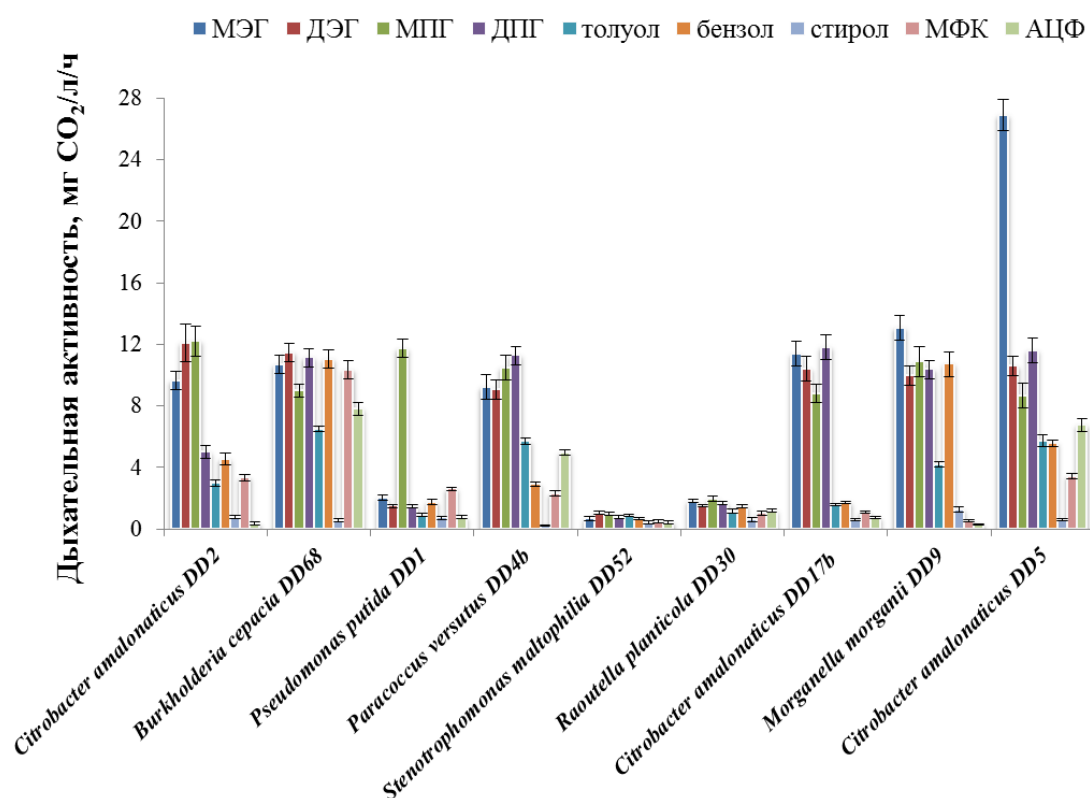


Рисунок 12. Дыхательная активность доминирующих изолятов, предварительно выращенных на МЭГ и окисляющих бинарные смеси спустя 12ч роста

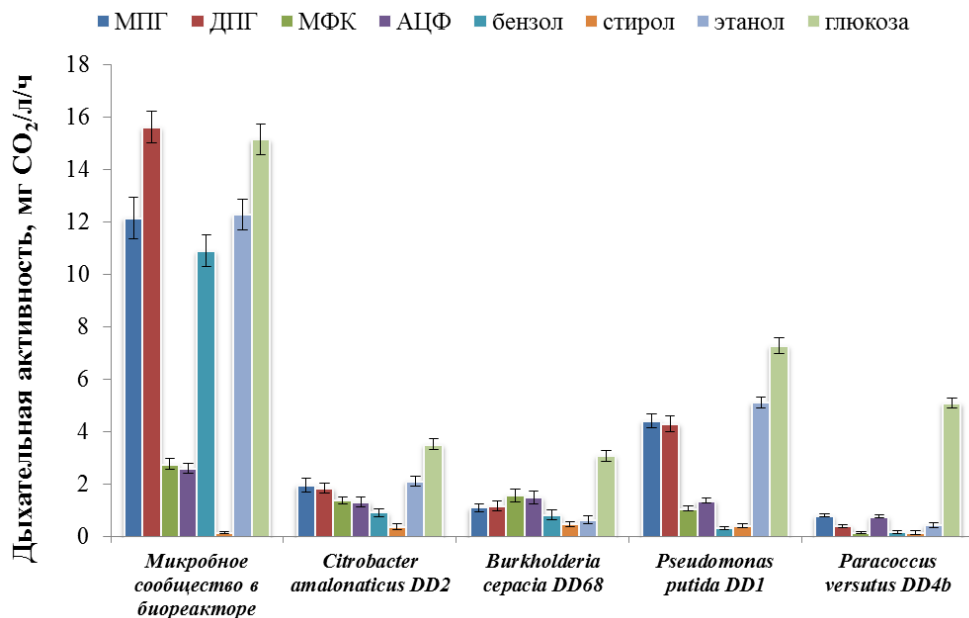


Рисунок 13. Дыхательная активность доминирующих изолятов, предварительно выращенных на МПГ и окисляющих бинарные смеси спустя 12ч роста

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследуемая установка предочистки СВ совместного ПСОП показала принципиальную применимость биологического подхода к детоксикации экстремально загрязненной СВ и сделала обработанную СВ совместимой с простейшими в активном иле и пригодной для дальнейшей полной очистки традиционным биологическим методом в аэротенках. Мы установили, что бактерии родов *Citrobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* и *Paracoccus* были доминирующими в биореакторе и способными к биоразложению основных компонентов данной СВ. Полученные нами данные о структуре микробного сообщества и метаболическом потенциале отдельных изолятов перспективны для улучшения процедуры предварительной очистки СВ при увеличении спектра изолятов, которые могут разлагать более токсичные и устойчивые ксенобиотики. Следовательно, выбор доминирующих изолятов, их идентификация и внедрение во многом определяют работу очистного сооружения и экологическую безопасность производства. Расшифровка структуры микробного сообщества – это ключ к созданию рациональной и функционально стабильной системы очистки, регулирование которой может осуществляться интродукцией целевых групп бактерий – компонентов сообщества. Лучшее понимание микробных сообществ, участвующих в процессе очистки СВ, не только позволяет обеспечить стабильную работу систем очистки, но и вносит вклад в фундаментальные аспекты микробной экологии (Oerther et al., 2001; DeAngelis et al., 2011). Проведенная экспериментальная работа позволила сделать следующие основные заключения:

1. СВ совместного ПСОП обладает высокой токсичностью по отношению к растениям (*Secale cereale*, *Pisum sativum*), простейшим (*Paramecium caudatum*), слабой токсической активностью по отношению к тестерному штамму *Salmonella typhimurium* TA98, слабым генотоксическим действием по отношению к штамму *S. typhimurium* TA1535/pKK1002, но не проявляет мутагенную активность по отношению к штамму *S. typhimurium* TA98.

2. Культивируемые аэробные микроорганизмы отсутствуют в необработанной СВ, а в биореакторе их численность составляет в 10^7 - 10^8 КОЕ/мл суспендированной микрофлоры и 10^{11} КОЕ/г иммобилизованной микрофлоры; они представлены аэробными гетеротрофами, среди которых в количестве 10^5 КОЕ/мл суспендированной микрофлоры и 10^6 КОЕ/г иммобилизованной микрофлоры присутствуют дрожжи и микромицеты. Состав микробного сообщества варьирует в зависимости от концентрации компонентов поступающей СВ, нагрузки на очистное сооружение и развития микробного сообщества в биореакторе.

3. В биореакторе локальных очистных сооружений ПСОП выявлено 60 изолятов бактерий; с использованием молекулярных методов установлена таксономическая принадлежность доминирующих изолятов к филуму *Proteobacteria*: *Paracoccus versutus* (α -*proteobacteria*), *Achromobacter* sp., *Burkholderia cepacia* (β -*proteobacteria*), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas*

putida, *Morganella morganii*, *Citrobacter amalonaticus* и *Raoultella planticola* (γ -*proteobacteria*), а также филумам *Bacilli*: *Lysinibacillus fusiformis* DD17, и *Actinobacteria*: *Brevibacterium* sp. и *Kocuria rosea* DD22.

4. Установлено, что отдельные доминирующие изоляты аэробных гетеротрофных бактерий могут использовать гликоли, фенол, стирол и МФК в качестве единственного источника углерода; комбинированное сообщество доминирующих изолятов в модельном биореакторе приводит к эффективному снижению концентраций фенола, МФК и АЦФ.

При исследовании активности дыхания на двухкомпонентных смесях на основе легкодоступных гликолей установлено, что гликоли и этанол оказывают стимулирующее действие на микрофлору биореактора, увеличивая интенсивность дыхания до 54%, и могут применяться в качестве косубстратов, тогда как летучие ароматические соединения, в особенности стирол и АЦФ, ингибируют дыхательную активность большинства изолятов на 24-99%.

Публикации по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Dao, L.** Full-scale bioreactor pretreatment of highly toxic wastewater from styrene and propylene oxide production / L. Dao, T. Grigoryeva, A. Laikov, R. Devjatijarov, O. Ilinskaya // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2014. – V. 108. – P. 195–202.

2. **Дао, Л. Т. Т.** Оптимизация работы установки биоочистки нефтехимических сточных вод с использованием иммобилизованной микрофлоры / Л. Т. Т. Дао, Т. В. Григорьева, О. И. Якушева, В. Н. Никонорова, О. Н. Ильинская // *Ученые Записки Казанского университета.* – 2013. – Т. 155. – № 2. – С. 138–146.

3. **Дао, Л. Т. Т.** Характеристика параметров предочистки нефтехимических сточных вод в биореакторе / Л. Т. Т. Дао, Т. В. Григорьева, Р. М. Девятяров, К. К. Нго, О. И. Якушева, В. Н. Никонорова, О. Н. Ильинская // *Вестник Казанского Технологического университета.* – 2013. – Т. 16. – № 7. – С. 158–160.

4. **Дао, Л. Т. Т.** Устранение пенообразования в биореакторе установки очистки нефтехимических сточных вод / Л. Т. Т. Дао, Т. В. Григорьева, К. К. Нго, О. И. Якушева, В. Н. Никонорова, О. Н. Ильинская // *Вестник Казанского Технологического университета.* – 2013. – Т. 16. – № 10. – С. 182–185.

5. **Дао, Л. Т. Т.** Очистка отработанного воздуха в установке предварительной обработки нефтехимических сточных вод / Л. Т. Т. Дао, К. К. Нго, О. Н. Ильинская // *Вестник Казанского Технологического университета.* – 2013. – Т. 17. – № 1. – С. 178–180.

6. **Дао, Л. Т. Т.** Анализ работы установки биоочистки нефтехимических сточных вод в биореакторе / Л. Т. Т. Дао, К. К. Нго, О. Н. Ильинская // *Вестник Казанского Технологического университета.* – 2013. – Т. 17. – № 12. – С. 88–90.

7. **Дао, Л. Т. Т.** Оптимизация процесса предварительной очистки сточных вод с помощью подачи биогенных добавок / Л. Т. Т. Дао, К. К. Нго, О. Н.

Ильинская // Вестник Казанского Технологического университета. – 2013. – Т. 17. – № 12. – С. 93–95.

8. **Дао, Л. Т. Т.** Особенности микрофлоры в установке предварительной очистки сточных вод нефтехимического производства / Л. Т. Т. Дао, К. К. Нго, О. Н. Ильинская // Вестник Казанского Технологического университета. – 2013. – Т. 17. – № 12. – С. 100–102.

Другие публикации по теме диссертации

9. **Dao, T. T. L.** Microbial community potential for purification of specific wastewater from petrochemical production / T. T. L. Dao, O. N. Ilinskaya // Materials of the I international scientific conference “Global Science and Innovation”. – Chicago, USA, 2013. – V. 2. – P. 73–76.

10. **Dao, T. T. L.** Pretreatment of high-concentrated petrochemical wastewaters by the combination of ozone and biological treatment / T. T. L. Dao, Q. Q. Ngo, O. N. Ilinskaya, A. A. Petukhov, T. V. Grigoryeva, E. I. Grigoriev, O. I. Yakusheva, V. N. Nhononova // Materials of the IV International research and practice conference “European Science and Technology”. – Munich, Germany, 2013. – P. 159–162.

11. **Дао, Л. Т. Т.** Особенности предварительной очистки высококонцентрированных сточных вод нефтехимического производства / Л. Т. Т. Дао, К. К. Нго, О. Н. Ильинская // Материалы X Международной научно-практической конференции “Ключевые аспекты научной деятельности”. – Пшемьсль, Польша, 2014. – С. 21–23.

12. **Дао, Л. Т. Т.** Особенности микробной деградации нефтехимических поллютантов высоконагруженных промышленных сточных вод / Л. Т. Т. Дао, Р. М. Девятияров // Материалы XX международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология». Ломоносов – 2013. – Москва, 2013. – С. 271–272.

13. **Дао, Л. Т. Т.** Оценка способов иммобилизации микрофлоры для создания технологии предобработки высококонцентрированных сточных вод нефтехимической промышленности / Л. Т. Т. Дао, Т. В. Григорьева // Материалы XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология». Ломоносов – 2014. – Москва, 2014. – С. 204–205.

14. **Дао, Л. Т.** Возможности биологического обезвреживания высококонцентрированных нефтехимических сточных вод производства стирола и окиси пропилена / Л. Т. Дао, Т. В. Григорьева, А. В. Макеева, О. И. Якушева, В. Н. Никонорова, Р. П. Наумова // Материалы международной научно-практической конференций молодых ученых и специалистов «Биотехнология в решении экологических проблем природы, общества и человека в Евразии: взгляд молодых ученых и специалистов». – Казань, 2013. – С. 53–54.

15. **Дао, Л. Т. Т.** Характеристика структуры микробного сообщества, участвующего в предварительной очистке нефтехимических сточных вод / Л. Т. Т. Дао // Материалы VII-й Международной студенческой научной конференции

«Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии». – Ульяновск, 2014. – С. 72–73.

16. **Дао, Л. Т.** Возможности предварительной биологической очистки высоконагруженных сточных вод нефтехимического производства / Л. Т. Дао, О. Н. Ильинская // Материалы III Всероссийской молодежной научной конференции «Естественнонаучные основы теории и методов защиты окружающей среды». – СПб, 2014. – С. 44–45.

17. **Дао, Л. Т. Т.** Особенности биологического обезвреживания высоконагруженных сточных вод нефтехимического производства / Л. Т. Т. Дао // Материалы IV конференции молодых специалистов «Инновация и молодежь – два вектора развития отечественной нефтехимии». – Нижнекамск, 2014. – С. 121.

18. Нго, К. К. Очистка водного стока узла получения стирола дегидратацией метилфенилкарбинола / К. К. Нго, **Л. Т. Т. Дао**, Е. И. Григорьев, А. А. Петухов // Материалы X Международной научно-практической конференции “Ключевые аспекты научной деятельности”. – Пшемьсль, Польша, 2014. – С. 70–72.

19. Нго, К. К. Pretreatment of highly polluted petrochemical wastewater / К. К. Нго, **Л. Т. Т. Дао**, Е. И. Григорьев, А. А. Петухов, О. Н. Ильинская // Research Journal of International Studies. 2014. – Т. 26. – № 7. – С. 54–55.

20. Девятяров, Р. М. Специализированная микрофлора, как основа локальной биологической предочистки нефтехимических сточных вод / Р. М. Девятяров, **Л. Т. Дао**, Я. Н. Закирова, А. В. Лайков, Р. П. Наумова // Материалы XVII Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – Москва, 2013. – С. 13.

21. Девятяров, Р. М. Рационализация очистки нефтехимических сточных вод с помощью азотфиксации / Р. М. Девятяров, Я. Н. Закирова, **Л. Т. Дао**, Т. В. Григорьева, О. И. Якушева, В. Н. Никонорова, Р. П. Наумова // Материалы международной научно-практической конференций молодых ученых и специалистов «Биотехнология в решении экологических проблем природы, общества и человека в Евразии: взгляд молодых ученых и специалистов». – Казань, 2013. – С. 89–91.

22. Несмелов, А. А. Физическая гетерогенность и биоремедиация / А. А. Несмелов, Р. П. Наумова, **Л. Дао** // Материалы VI международного научного семинара «Фундаментальные исследования и инновации» и Всероссийского молодежного научного семинара «Наука и инновации – 2011». – Йошкар-Ола, 2011. – С. 387–392.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЦФ – ацетофенон
БПК – биологическое потребление кислорода
БПК₅ – биологическое потребление кислорода за 5 суток инкубации
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДПГ – дипропиленгликоль
ДЭГ – диэтиленгликоль
КОЕ – колониеобразующие единицы
МПП – монопропиленгликоль
МЭГ – моноэтиленгликоль
МФК – метилфенилкарбинол
ОАО «НКНХ» – открытое акционерное общество «Нижекамскнефтехим»
ПСОП – производство стирола с окисью пропилена
рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота
СВ – сточная вода
ХПК – химическое потребление кислорода
OD₆₀₀ – оптическая плотность при длине волны 600нм

Е-mail автора: linhdao.kpfu@gmail.com

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. Email: ziabramova@mail.ru